

Lilian Mally Elisabeth Storm
Dr. med.

Ein doppelt induzierbares System für die RNA-Interferenz in *Trypanosoma brucei*

geboren am 21.07.1976 in Berlin
Staatsexamen am 06.04.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie
Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. R. Luise Krauth-Siegel

Der Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit, *Trypanosoma brucei*, stellt für die Medizin eine therapeutische Herausforderung und für die Molekularbiologie einen wichtigen Modellorganismus dar. Im Rahmen des Trypanosomen-Genomprojekts konnte das gesamte Genom des Parasiten entschlüsselt werden, so dass intensiv an der Funktion essentieller Gene geforscht werden kann. Dazu ist ein einfaches und schnelles System zur Herstellung konditionaler *Knockout*-Mutanten notwendig. Die Methode der Wahl stellt dafür derzeit die RNA-Interferenz dar.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten vielfältige Aspekte der Handhabung der induzierbaren RNA-Interferenz in *T. brucei* optimiert werden. Der unter anderem für das Genomprojekt verwendete RNAi-Vektor p2T7^{Ti}:TABlue enthält zwei gegensinnig angeordnete, mit *Tet*-Operatoren versehene T7-Promotoren, zwischen die eine Kopie der Zielsequenz kloniert wird. Mit Trypanosomen, die sowohl eine T7-RNA-Polymerase als auch den *Tet*-Repressor exprimieren, läßt sich dann auf schnelle und einfache Weise die gewünschte dsRNA erzeugen. Im nicht induzierten Zustand ist eine möglichst geringe Aktivität der T7-Polymerase notwendig, da es ansonsten unkontrolliert zur RNA-Interferenz und so bei einem essentiellen Gen zum Absterben der Kultur kommen kann. Es wurde ein Ansatz gewählt, der die T7-RNA-Polymerase unter die Kontrolle eines um 70% abgeschwächten, Tetracyclin-induzierbaren *EP1*-Promotors brachte. Die Regulation der Expression der T7-Polymerase steuert auf diese Weise ihrerseits die von den T7-Promotoren kontrollierte Transkription. Mit einem konstitutiven T7-Promotor konnte so eine zwanzigfache Regulationsbreite demonstriert werden.

Um die experimentelle Genexpression für den gesamten Lebenszyklus der Trypanosomen zu erleichtern, wurde ein Vektor hergestellt, mit dem sich sowohl in der Säugetierform als auch in der Insektenform des Parasiten verlässlich hohe Mengen an *Tet*-Repressor erzeugen lassen. Dieser neue Vektor, pHD 1313, enthält zwei Kopien des *Tn10 Tet*-Repressors aus *E. coli* und stellt eine Weiterentwicklung des Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems in *T. brucei* dar. Mit pHD 1313 konnten sowohl mit den im Trypanosomen-Genomprojekt verwendeten TREU927-Trypanosomen als auch mit den etablierten STIB427-Zellen jeweils für beide Stadien des Lebenszyklus Zelllinien hergestellt werden, die den Repressor exprimieren. Diese Zelllinien werden seitdem erfolgreich für die RNA-Interferenz mit induzierbaren Konstrukten genutzt.

Die den *Tet*-Repressor doppelt exprimierenden Trypanosomen stellen in Kombination mit der über den mutierten *EP1*-Promotor induzierbaren T7-Polymerase eine gute Alternative zu bislang verwendeten Zell-Vektor-Kombinationen für die RNA-Interferenz dar. Mit dem für das Genomprojekt weiterentwickelten RNAi-Vektor p2T7^{Ti}:TABlue, der eine unkomplizierte Klonierung auch unmodifizierter PCR-Produkte erlaubt, konnte mit dieser Zell-Vektor-Kombination in der Säugetierform für Clathrin ein reproduzierbarer *Knockout*-Phänotyp

erreicht werden. Dieser Phänotyp war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie in vorangegangenen Experimenten mit dem sogenannten *Stem-loop*-Verfahren.

Schließlich konnte ein zuverlässiges und effizientes induzierbares System für die RNA-Interferenz in *T. brucei* etabliert werden, welches für Arbeiten mit der Säugetierform eine Alternative zur *Single Marker*-Zelllinie von E. Wirtz darstellt und für Arbeiten mit der Insektenform des Parasiten, insbesondere in Kombination mit dem p2T7^{Ti}:TABlue-Interferenz-Vektor, als Zelllinie der Wahl gelten kann, wenn eine einfache, schnelle Klonierung und hohe Transfektionseffizienz gewünscht werden. Da es aber nicht in allen Fällen möglich war, mit der neuen Zell-Vektor-Kombination einen sichtbaren, vorbeschriebenen Interferenzeffekt zu reproduzieren, wird für einige Anwendungen immer noch die zeitintensivere Methode des *Stem-loop*-Verfahrens der Goldstandard bleiben. Für RNA-Interferenz mit *Stem-loop* sind die neuen 1313-Zellreihen jedoch ideal.

Die vielfältigen Erfahrungen, die im Rahmen dieses Projekts im Umgang mit verschiedenen Zelllinien und Vektoren für die RNA-Interferenz in *T. brucei* gesammelt werden konnten, haben zu praxisorientierten, nun weitgehend standardisierten methodischen Vorschlägen geführt, welche die Durchführung einer RNA-Interferenz in diesem Parasiten insgesamt einfacher, schneller und anwenderfreundlicher machen.